



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap (BVF)

***Streptococcus equi* subsp. *equi*- en jämförelse av provtagnings- och analysmetoder**

Hanna Jönsson

*Uppsala
2017*

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2017:46

***Streptococcus equi* subsp. *equi*- en jämförelse av provtagnings- och analysmetoder**

***Streptococcus equi* subsp. *equi* - a comparison of sampling- and analytical methods**

Hanna Jönsson

Handledare: Ingrid Hansson, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF), enheten för bakteriologi och livsmedelssäkerhet

Examinator: Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF), enheten för parasitologi

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serie: 2017:46

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *Streptococcus equi* subsp. *equi*, Kvarka, PCR, bakteriell odling, ELISA, diagnostiering

Key words: *Streptococcus equi* subsp. *equi*, Strangles, PCR, bacterial culture, ELISA, diagnostics

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
MATERIAL OCH METODER	3
LITTERATURÖVERSIKT	4
Smittspridning.....	4
Symptom	4
Kliniska bilden	4
Diagnostiska metoder	5
Provtagning	5
Epidemiologiska undersökningar.....	6
PCR	7
Odling.....	8
Serologi iELISA.....	9
Förekomst i Sverige	10
DISKUSSION	13
Provtagning	13
PCR	13
Odling.....	14
Serologi iELISA.....	15
Förekomst i Sverige	15
LITTERATURFÖRTECKNING	16

SAMMANFATTNING

Kvarka är en allvarlig, smittsam mukopurulent luftvägssjukdom som orsakas av bakterien *Streptococcus equi* subsp. *equi*. För att förhindra smittspridning är det viktigt att snabbt identifiera eventuellt smittade hästar. Denna litteraturstudie fokuserar på vilka provtagnings- och analysmetoder som är att föredra vid misstanke om kvarka.

Prover med frågeställningen kvarka kan tas från ett flertal provtagningsställen såsom näshålan, luftsäckarna, abcesser, lymfknotor eller via blodprover. I dagsläget tas prover från hästar med misstänkt kvarka framför allt med hjälp av svabbprover men också via sköljprover. Den senare metoden har visat sig vara något mer effektiv då en större yta provtas, men resultatet beror även på vart proverna tas ifrån. Vid kronisk kvarka har det visat sig vara effektivast att ta prover från luftsäckarna då bakterien gärna koloniserar luftsäckarna och sedan intermittent utsöndras vidare till näshålan. Näshålan är dock anatomiskt lättare att provta men beroende på analysmetod kan då hästar utan symptom (kroniker) lätt förbises som falskt negativa. Den kliniska sjukdomsbilden är även viktig att beakta vid diagnostiken då kvarka är allmänt känt för sitt bilaterala mukopurulenta näsflöde, feber och svullna lymfknotor i huvud-halsregionen.

Proverna kan analyseras med hjälp av olika metoder så som Polymerase chain reaction (PCR), bakteriell odling och ELISA. PCR är en tidseffektiv analysmetod som med hög sensitivitet och specificitet kan upptäcka infekterade hästar, men PCR detekterar även DNA från döda bakterier vilket kan ge falskt positiva resultat. Detta anses däremot inte som ett problem då alla positiva provresultat bör tas på allvar och det förekommer ofta att kroniska smittbärare periodvis inte utsöndrar bakterien och då kan DNA, från icke levande bakterier, från näshålan tyda på förekomsten av levande bakterier i luftsäckarna. En bakteriell odling är mer tidskrävande och risken finns att ett kraftigt kontaminerat prov kan innebära ett falskt negativt resultat. Fördelen är dock att bakterier som kan ge kvarkaliknande symptom kan påvisas och utredas. En odling är alltid beroende av att adekvat infektiöst material finns. Vid låga koncentrationer av en patogen är PCR en metod att föredra då den kan detektera även mycket små mängder bakterier. ELISA används för tillfället inte så frekvent och betraktas inte som en adekvat diagnostiseringsmetod för kvarka, detta på grund av korsreaktionen som kan uppstå med ett specifikt protein från *S. zooepidemicus* vilken kan ge ett falskt positivt analysresultat. Det kan dock användas som indikation på att fortsatt utredning är nödvändig samt påvisa hästar med purpura hemorrhagica.

SUMMARY

Strangles is a severe, highly contagious, mucopurulent equine respiratory disease caused by the bacteria *Streptococcus equi* subsp. *equi*. In order to prevent the infection from spreading it is crucial to correctly identify potentially infected horses. This essay is focused on a comparison of sampling- and diagnostics methods at a presumed outbreak of strangles.

Samples can be taken from multiple sampling sites such as the nasal passage, guttural pouches, abscesses, lymph nodes or by blood samples. Today, samples from infected horses are gathered using swabs and lavages. Lavages has proven too be a bit more effective because a larger surface in the nasal cavity is being tested, but the results also depend on the sampling site. In persistently infected horses the guttural pouches has proven to be the most effective sampling site, thus bacteria are likely to accumulate there and intermittently discharge in to the nasal cavity. The nasal cavity is easy to reach and sample, however depending on the analysis method, horses without any clinical signs can appear as false negative. Clinical signs are also important to take in to consideration at diagnosis thus signs of strangles classically include mucopurulent nose discharge, fever and periorbital swelling.

The samples can be analyzed through PCR, bacterial culture and ELISA. PCR is a time effective method with high sensitivity and specificity while successfully identifying infected horses, however PCR can also detect DNA from dead or modified live vaccine bacteria. This is although not considered an issue whereas all positive results should be taken seriously. Persistently infected horses can shed bacteria sporadically and in these cases DNA from dead bacteria could indicate a carrier of alive bacteria in the guttural pouches. Bacterial culture is more time-consuming and there is also a risk of over growth of other bacteria, resulting in a false negative sample. The advantage of this method is however that you can detect the presence of other bacteria causing strangles-like symptoms. At low concentrations of the pathogen a PCR is always the preferred method though it can detect very low quantities of bacteria. ELISA is not used as frequently and is not considered too be an adequate diagnostics method for strangles, due to its possibility to cross-react with a specific *S. zooepidemicus* protein and therefor cause a false positive result. It is however used as an indication that further diagnostic procedures are necessary and also to detect horses with purpura hemorrhagica.

INLEDNING

Luftvägsinfektioner är betraktat som ”the major hazard” för hästar över hela världen (Neamat-Allah, A. N. F & El Damaty, H, M, 2016). Kvarka är en mycket smittsam och allvarlig infektiös luftvägssjukdom hos häst orsakad av bakterien *Streptococcus equi* subsp. *equi* (*S.equi*). Nästan 30% av alla inrapporterade luftvägsinfektionerna hos häst orsakas av *S. equi* (Cordoni *et al.*, 2015). Till skillnad från vissa andra Streptococci anses inte *S.equi* tillhöra normalfloran i luftvägarna hos häst utan påvisas endast i samband med sjukdom (Vetbact.org, 2017). Morbiditeten är hög för *S. equi* men mortaliteten låg, och antalet sjukdomsfall med dödlig utgång varierar mellan 2,7 till 3,6% (Tirosh-Levy *et al.*, 2016). En högre mortalitet ses dock hos de 20% av hästarna där komplikationer tillstöter då 40% av dessa dör eller måste avlivas (Taylor & Wilson, 2006). Empyem i luftsäckarna är en av de vanligaste komplikationerna, detta orsakas av att abscesser i lymfknutorna rupturerar in i luftsäckarna eller att infektionen sprids från farynx via de salpingo-faryngala öppningarna. Purpura hemorrhagica är en immunmedierad hypersensitivitet som kan uppkomma till följd av en infektion av *S. equi* (Taylor & Wilson, 2006). Ett viktigt steg i hindra smittspridningen av kvarka är att tidigt identifiera och isolera smittade djur (Mallicote, 2015).

Streptococcus equi subsp. *equi* är en betahemolyserande, grampositiv orörlig kock tillhörande Lancefield's grupp C. Den är fakultativt anaerob och skiljs från *S. zooepidemicus* genom att *S. equi* inte kan fermentera trehalos, laktos eller sorbitol (VetBact.org, 2017). *S. equi* har en förmåga att undvika fagocytos via dess kapsel av hyaluronsyra och M-protein (SeM) (Mallicote, 2015). *S. equi* överlever inte länge i omgivningsmiljöer och speciellt inte då de exponeras för direkt solljus (Waller, 2014).

Syftet med denna litteraturstudie är att undersöka huruvida det finns en analyserings- och provtagningsmetod som är att föredra vid misstanke om kvarka.

MATERIAL OCH METODER

Litteratur är hämtad från databaserna PubMed, Scopus och Web of science. Sökorden som användes var (*Streptococcus equi*) AND (Horse* OR Equine) AND (Diagnostic).

Grundläggande information om bakterien, förekomst i Sverige, olika provtagningsmetoder samt utrustning har hämtats från VetBact (www.Vetbact.org), Sveriges veterinärmedicinska anstalt (www.sva.se), Equine Speciality Instruments (www.germedusa.com), Jordbruksverket (www.jordbruksverket.se) och Medical dictionary (www.medical-dictionary.thefreedictionary.com).

LITTERATURÖVERSIKT

Smittspridning

Kvarka är en mucopurulent luftvägssjukdom orsakad av *S. equi* som smittar via indirekt eller direkt överföring. *S. equi* utsöndras via nosen hos akut eller persistent infekterade djur och smittar via direkt kontakt med nosflöde från smittbärare exempelvis genom att nosa på en infekterad häst, smittad boxinredning, utrustning, kläder eller kontaminerat dricksvatten där bakterien kan överleva upp till en månad (Waller, 2014). Infektionen startar i tonsillernas kryptceller och angränsande lymfknutor där bakterien sedan utsöndrar enzymer och toxiner vilka startar en inflammation. Hästarna får klassiskt rhinit, faryngit, feber och anorexi. Inom 24 timmar efter påbörjad feber kan ett bilateralt muköst näsflöde ses och bakterien förflyttar sig till de submandibulära- och retrofaryngallymfknutorna vilket kan leda till dysphagi.

Debris ansamlas och abcesser bildas i de drabbade lymfknutorna då fagocytosen ofta är ofullständig. Bakterien kan spridas vidare såväl hematogent som lymfogent och bilda abcesser i andra lymfknutor bortom huvudregionen (Taylor & Wilson, 2006). Abcesser som bildas i de retrofaryngala och submandibulära lymfknutorna spricker vanligtvis efter 1-4 veckor, detta innebär en risk för att böldinnehåll läcker till luftsäckarna, som kan ge mukopurulent näsflöde tydligt förknippat med sjukdomsbilden för kvarka (Waller, 2014). Förekomsten av kondroider, intorkat slem, verkar som en reservoar för infektionen vilket ger en utdragen process där det infekterade djuret förblir smittbärare under en längre period. Kvarka är en extremt smittsam sjukdom med en morbiditet på nästan 100% (Furniss *et al.*, 2007).

Vissa hästar kan inhysa *S. equi* som kliniskt tysta bärare och utsöndra bakterien intermittent. Uppskattningsvis blir 10% av de drabbade hästarna kroniker och långtidsutsöndrare av bakterien, där det vanligaste är att bakterien koloniserar i luftsäckarna. Identifiering av kroniker är av största vikt i arbetet att förhindra smittspridningen (Tirosh-Levy *et al.*, 2016) och infektiöst material hos dessa hittas ofta i luftsäckarna (Mallicote, 2015).

Symptom

Kliniska bilden

Den kliniska bilden för kvarka är klassisk för luftvägsinfektioner men problem att diagnosticera sjukdomen kan uppstå i tidiga eller atypiska fall där de svullna lymfknutorna eller det nasala flödet inte är lika tydligt (Fintl *et al.*, 2000). Provtagning ska göras på alla misstänkta fall men görs främst på de hästar som uppvisar submandibulär och retrofaryngal lymfadenopati och/eller purulent näsflöde samt feber. Generellt visar en klinisk undersökning i detta läge inga andra märkbara förändringar men auskultation av thorax och endoskopi är att rekommendera då en infektion av *S. equi* kan orsaka sekundära pneumonier (Mallicote, 2015).

Fibrooptisk endoskopi bidrar med viktig information i undersökningen av luftvägarna hos häst där luftsäckarna är en vanlig infektiönsplats för patogener. Empyem och kondroider som ofta är förknippat med kvarka kan ses i luftsäckarna och endoskoperingen möjliggör både en visuell bild och möjligheten till att provta området för en cytologisk undersökning (Pusterla *et al.*, 2006).

Diagnostiska metoder

Provtagning

Provtagningsställe

I det akuta stadiet är det rekommenderat att ta prover direkt från det infekterade området, exempelvis en lymfknodeabcess eller från luftsäckarna om empyem ses. Prover kan också tas från purulent debris, luftsäckssköljning eller via punktion av perkutana lymfknotor (Mallicote, 2015). Nässköljprover tas genom att ca 120 ml natriumklorid (9mg/ml) spolas in i näshålan via en slang, vätskan samlas ihop, provet centrifugeras och odlas på blodagar i 37°C (Taylor & Wilson, 2006). Alternativt kan luftsäckarna undersökas via endoskopi eller provtas blint via en så kallad Chambers kateter (Mallicote, 2015), en kateter i rostfritt stål med en lätt böjd topp som används för provtagning av luftsäckarna (*Chambers Catheter - Equine Speciality Instruments*).

Studier av Lindahl *et al.* (2013) har visat att prover tagna från abcesser hos drabbade hästar är odlings- och Polymerase chain reaktion (PCR) positiva i 30% respektive 80% av fallen. De låga resultaten kan bero på låg bakterieutsöndring hos individen, variation i provtagningsmetod och/eller potentiell överväxt av andra patogener (Lindahl *et al.*, 2013). Detta då luftvägarna hos häst normalt innehåller en normal bakterieflora, så kallade kommensaler (Pusterla *et al.*, 2006).

Enligt Pusterla *et al* (2006) och Boyle *et al* (2012) är odling av prover från luftsäckssköljningar en känsligare metod för att identifiera kroniska smittbärare jämfört med odling av nasofaryngala svabbar. Provtagning via sköljprov från luftsäckarna eller faryngalområdet har alltså högst sensitivitet enligt Mallicote (2015). Vid provtagning av näshålan är sköljningar mer fördelaktigt än svabbar då en större yta i näshålan provtas (Taylor & Wilson, 2006).

Provtagningsutrustning

I en studie av Boyle *et al.* (2012) pendlade sensitiviteten och specificiteten för PCR via nasofaryngal svabb mellan 45-50% respektive 71%, medan nasofaryngala svabbar från odling varierade mellan 18-45 och 94%. När tre efterföljande nasofaryngala svabbar odlades ökade sensitiviteten till 85% (Boyle *et al.*, 2012). För några år sedan lanserades flocked swabs inom humanmedicinen, en provtagningspinne som med sina tofsar av polyestermaterial fäst vid ett plastskaf. Denna används för provtagning vid misstanke om bakterier eller virala patogener (*flocked swab*, 2012), och har visat sig öka sensitiviteten både vid såväl bakteriell odling som PCR då den ger en förbättrad provtagning genom underlättad patogeninsamling samt effektivt frigörande av provtagningsmaterialet. Däremot så minskade sensitiviteten vid centrifugering av proverna innan odling (Boyle *et al.*, 2012). Samtidigt menar Lindahl *et al.* (2013) att nylonsvabbar så som E-swab har visat sig släppa ifrån sig fler bakterier än rayonsvabbar. E-swab var den effektivaste av alla svabbar i att återvinna *S. equi* via PCR direkt från proverna i studien. Även transportmediet som medföljer E-swab är lämpligt för förberedandet av DNA direkt samt för odling. Endast den vanliga bomullssvabben var statistiskt sämre än resterande provtagningsmetoder och anses enligt Lindahl *et al.* (2013) olämplig för provtagning.

När resultaten från en PCR gjord på material från en bakteriell odling kombinerades med en PCR på prover tagna direkt från ett nasofaryngalt sköljprov, studerades en ökning i antalet positiva analys svar som nu ökade till 91% (Lindahl *et al.*, 2013). Vid Realtids-PCR på kombinationer av flera prover sågs *S. equi* hos mer än 90% av hästarna med kliniska symptom. Studien kom även fram till att ett enkelt nasofaryngalsköljprov analyserat via quantitative-PCR (qPCR) direkt från provtagning i kombination med qPCR från en odling utgör den optimala provtagningen. Samtidigt anser Lindahl *et al.* (2013) att det är lika effektivt att köra en realtids-PCR direkt från ett nasofaryngalt sköljprov och ytterligare ett enkelt svabbprov från näshålan.

Kroniker

För att begränsa smittspridningen isoleras sjuka djur under fyra veckor efter utbrott. Vissa länder ger inga tidsgränser utan rekommenderar istället tre bakteriologiska provtagningar från nasofaryngala svabbar som alla ska vara negativa för att kunna häva isoleringen. Dock har det påvisats att individer kan utsöndra *S. equi* intermittent vilket gör att de kan vara odlingsnegativa över en period på flera veckor eller månader men ändå sprida smittan vidare. Det är därför viktigt med odlingar av sköljprover från luftsäckarna för att kunna upptäcka eventuella tysta smittbärare (Waller & Jolley, 2007). I ytterligare en studie fann man att luftsäckarna var huvudplatsen för *S. equi* efter en infektion och det rekommenderades att luftsäckarna bör undersökas hos de hästar som misstänktes vara kroniska smittbärare. Det fanns även fler positiva prover från odlingar av luftsäckssköljningar än från nasofaryngala svabbar (88% jämfört med 45% sensitivitet) (Boyle *et al.*, 2016). En god korrelation noterades mellan endoskopiska fynd och resultaten från odlingarna av luftsäckssköljproverna. Intermittent utsöndring av *S. equi* från luftsäckarna till de nasofaryngala delarna gör alltså den nasofaryngala regionen mindre lämplig för provtagning trots att det är ett kliniskt lättåtkomligt provtagningsställe (Boyle *et al.*, 2016). Luftsäckarna bör därför ligga i fokus då utredningar av kroniska bärare av kvarka görs (Fintl *et al.*, 2000). PCR kan upptäcka DNA i den nasofaryngala delen vars ursprung är från levande bakterier i luftsäckarna och studien fann även att tre påföljande negativa prover inte alltid var tillräckliga för att upptäcka bärare av *S. equi* (Newton *et al.*, 2000)

Epidemiologiska undersökningar

Pulsifierande gelelektrofores (PFGE) har använts flertalet gånger i epidemiologiska studier för att jämföra och undersöka likheter samt olikheter mellan *S. equi*-stammar. Det antifagocytiska M-proteinet (SeM), som endast finns hos *S. equi*, underlättar spårningen av en smitta via dess N-terminalregion (Lindahl *et al.*, 2011). SeM bidrar med en viktig virulensfaktor då det aktivt binder in fibrinogen och IgG vilket inhiberar dispositionen av C3b på bakteriens yta och då förhindrar fagocytos (Waller & Jolley, 2007). En svensk studie påvisade att 59 av 60 kliniska isolat av *S. equi* hade en fullång SeM-gen, samt att variationer mellan svenska isolat i SeM-genen förekommer. De kunde även hänvisa till att de flesta funna stammarna var identiska med SeM-9, en tidigare utredd SeM-allel från kvarkautbrott i Storbritannien. Gensekvensering av SeM-genen var generellt överens med PFGE, men data tyder på att sekvensering är ett känsligare verktyg för att skilja stammarna åt, vilket stödjer användningen av gensekvensering för att förbättra epidemiologiska utredningar (Lindahl *et al.*, 2011).

PCR

Quantitative PCR (qPCR)

Vid Polymerase chain reaktion (PCR) spåras arvsmassan hos en patogen genom användning av primers som fäster vid två specifika punkter i patogenens arvs massa och denna emellan liggande del kommer sedan att kopieras tills att den är mätbar. För varje cykel fördubblas antalet kopior av den önskvärda DNA-sekvensen, i vårt fall sekvensen för *S.equi* SeM-gen (Taylor & Wilson, 2006). Detta möjliggör både mätning och spårning av en patogen även då den bara finns i mycket små mängder (SVA, 2016)

En variant av den vanliga PCR är real-tids PCR, även kallad quantitative PCR (qPCR), där de superantigenkodande generna utnyttjas som diagnostiska måltavlor för detektion av *S. equi* (Waller, 2014). Quantitative PCR riktar in sig på generna *SodA* och *seel* vilka används för att påvisa skillnaden mellan *S. equi* och *S. zooepidemicus*. Utvecklingen har minskat analys tiden till två timmar och dessutom bidragit med en ökad sensitivitet. Detta genom detektionen och kvantifieringen av en fluorescensmarkör, en signal som ökar proportionerligt till PCR-produkten i reaktionen (Ritz & Spiess, 2008). Sannolikheten att upptäcka *S.equi* ökade i den här studien med 13% då PCR kördes från agarplattor till skillnad från vanlig odling (Båverud *et al.*, 2007). Dessutom är denna teknik snabbare, kräver mindre manuell hanteringstid, är mindre sannolikt att bli kontaminerad och eliminerar post-amplifikations steg. qPCR tillåter också kvantifiering av DNA- och RNA-innehåll i ett givet prov (Pusterla *et al.*, 2006).

Då denna analys inte skiljer på döda och levande bakterier så behöver ett positivt analys svar inte alltid innebära en aktiv infektion, utan en sekundär odling kan vara bra för att bekräfta diagnosen. Det är därför oerhört viktigt att provtagningsutrustningen rengörs och desinficeras ordentligt mellan varje provtagning för att förhindra dessa falskt positiva provsvar (Mallicote, 2015). PCR är uppskattningsvis 3 gånger känsligare än en vanlig odling när det kommer till att upptäcka *S. equi*. En studie av Taylor & Wilson (2006) påvisade att endast 61% av smittade hästar var odlingspositiva genom provtagningsmaterial taget från nasofaryngal svabb eller aspirat från en förstorad lymfknuta. Detta kan bero på ett för lågt antal insamlade organismer, överväxt av andra bakterier eller en för långsam tillväxt. Det är bara en liten del av det insamlade materialet från en näshålesvabb som används till att stryka ut på blodagar jämförelsevis mot DNA extraktion där hela svabben används (Taylor & Wilson, 2006).

Vid en jämförelse av PCR och odling påvisades det att fler svabbar var positiva om PCR användes, 56% jämfört med odling 30% (Newton *et al.*, 2000). Liknande resultat sågs för luftsäcksprover där 76% var PCR positiva och 59% var odlingspositiva. I luftsäckarna påvisades *S. equi* hos 5 av 6 deltagande hästar som inte visade några symptom. Vid närmare undersökningar upptäcktes det att hästarna kunde utsöndra *S. equi* och analyserades som positiva via luftsäckprover i ytterligare två till tre månader men visade sig samtidigt vara negativa vid nasofaryngalprovtagning (Newton *et al.*, 2000).

PCR har blivit en viktig diagnostiseringsmetod i kvarkasammanhang, speciellt när det kommer till de icke synbara smittospridarna och hästar som ej visar de klassiska symptomen. PCR är alltså en metod med hög sensitivitet och har en nyckelroll att hitta symptomlösa smittbärare. Problematiken med denna metod är dock att en PCR även påvisar DNA från döda bakterier och

kan således ge ett falskt positivt svar (Mallicote, 2015). PCR har även visat sig vara en känsligare metod att använda på kliniska svabbar än odling, *S. equi* har oftare påvisats med hjälp av PCR (92%) jämfört med odling (30%) av 61 svabbar positiva respektive. PCR möjliggör även en separation mellan de två subtyperna *S. equi* och *S. zooepidemicus* (Cordoni *et al.*, 2015).

Vid de fall där veterinären av ekonomiska eller andra skäl endast kan använda en provtagningsmetod så rekommenderar Mallicote (2015) PCR då denna metod har högst sensitivitet och kan bidra till ett mer tillförlitligt uteslutande av *S. equi*. Studier av Boyle *et al.* (2012) visade att direkt PCR var den känsligaste metoden och statistiskt bättre än odling av flocked swabs och rayonsvabbar, traditionell PCR var känsligare än bakteriell odling av nasofaryngalasköljprover.

Nested PCR

Nested PCR innebär att primers som används i första omgången av amplifiering både är utbytta inför den andra och resterande cykler. Detta möjliggör en artspecifik och känslig metod för att diagnostisera *S. equi* utifrån kliniska prover. I en studie av Grønbæk *et al.* (2006) så testade alla 45 *S. equi* isolat positivt med nested PCR men ingen ökning noterades för de resterande 120 isolaten tillhörande Lancefield grupp C, vilket visar på metodens subspecies-specificitet. Det här visar på att PCR-metoden är användbar för att upptäcka *S. equi* i kliniska prover då falskt positiva prover troligen inte uppkommer. Falskt positiva provsvar från andra medlemmar i Lancefield grupp C skulle vara problematiskt då bakterier från denna grupp vanligtvis hittas i de övre luftvägarna hos häst, de utgör även ett problem då de misstänks inhysa liknande M-protein p.g.a. dess genomiska närhet till *S. equi*. En studie av Grønbæk *et al.* (2006) visade att sensitiviteten för nested PCR tagna från den nasala passagen var 45% och för prover tagna från abscesser 80%. Den motsvarande sensitiviteten för blodagar odling låg på 18% respektive 20% respektive. En 15 veckor lång intermittent utsöndringsperiod noterades, både hos hästar med och utan symptom. Sensitiviteten för såväl odling som PCR var högre för prover tagna från abscesser än från nasala svabbar. Detta beror troligen på att det finns en högre koncentration av bakterier i abscesserna än i näshålan (Grønbæk *et al.*, 2006).

Triplex qPCR

Denna modifierade metod riktar in sig på två *S. equi* specifika gener: eqbE och SEQ2190. Triplex qPCR har en sensitivitet på 94%, specificitet på 97% och upptäcker tiofaldigt lägre kvantiteter av *S. equi* jämfört med en vanlig odling oavsett närvaron av andra kontaminerande bakterier (Waller, 2014). Triplex qPCR reducerar antalet falskt negativa resultat vilket möjliggör upptäckt, isolation och behandling av infekterade hästar innan de kan sprida smittan vidare. Eftersom triplexanalysen endast kräver tillsatsen av primers och probes specifika för eqbE och SEQ2190 blir kostnaden inte nämnbart högre än en simplex studie (Webb *et al.*, 2013).

Odling

Analys av prover från luftvägarna på häst utförs på SVA genom direktodling på hästblodagar, blåagar med laktos samt Columbia blod agar (COBA agar). COBA innehåller colistin och oxolinsyra vilka hämmar tillväxten av bland annat gram-negativa bakterier. Samtliga plattor

odlas 24 plus 24 timmar i 37°C, hästblod agar och blå agar inkuberas i aerob atmosfär medan COBA inkuberas i koldioxid (5%) (Hansson, I., 2017, personlig kommunikation).

Alla odlingar förlitar sig på att adekvat infektiöst material finns och överlever i transportmediet. Utöver det så krävs det att bakterierna i provet, om det är taget från de övre luftvägarna, kan utkonkurrera normalfloran för att kunna identifieras korrekt (Mallicote, 2015). Odling av prov från luftvägarna kan försvåras av samtidig växt av *S. zooepidemicus* vilken ingår i normalfloran i övre luftvägarna hos häst. I en blandflora med minst två olika betahemolyserande Streptokocker kan det vara svårt att identifiera *S. equi* (Fintl *et al.*, 2000). Odling kan dock vara att föredra om luftvägsinfektionen orsakas av andra bakterier som kan ge kvarkaliknande symptom, exempelvis *S. zooepidemicus* och *Rhodococcus equi* (Grønæk *et al.*, 2006), vilket inte påvisas vid PCR enbart utvecklad för att påvisa *S. equi*.

Enligt Waller (2014) så misslyckades den vanliga odlingen i en studie med att detektera ca. 40% av de positiva qPCR proverna. Vissa forskare förklarar dessa resultat med att PCR kan detektera döda bakterier men detta avfärdar Waller (2014), som hävdar vikten av noggrann rengöring av utrustningen för att förhindra kontaminering av proverna med döda bakterier. I kombination med att DNA inte lever kvar på mukösa ytor innebär detta att alla positiva PCR resultat bör tas på allvar. I studien förklarades även 56% av de triplex positiva tillika odlings negativa proverna med närvaron av kontaminerande *S. zooepidemicus* och resterande 44% med dålig sensitivitet hos odlingen. Därför anser Waller (2014) att triplex qPCR bör anses som ”The golden standard”-testet.

Serologi iELISA

Nivåerna av SeM antikroppar i serum kan mätas via en indirekt enzymlänkad immunadsorberande analys (ELISA), där höga nivåer av antikroppar tyder på smittade hästar. Serologi kan vara användbart i diagnostiken av nyligen inträffad infektion och vid komplikationer p.g.a. infektioner. Serumtitrarna är som högst 4 till 5 veckor efter naturlig exponering och förblir höga i 6 till 8 månader efter. Falskt negativa provsvar kan förekomma om provtagning utförs inom 7 dagar efter exponeringen smittämnet, då antikroppar inte har hunnit bildas under denna tid (Taylor & Wilson, 2006). Nivåerna av antikroppar mot SeM-protein är högre hos hästar med purpura hemorrhagica, vilket det här testet kan användas för att påvisa (Waller & Jolley, 2007). Dock har SeM-protein en homolog i *S. zooepidemicus*, SzM, som öppnar upp möjligheten för att antikroppar riktade mot SzM kan korsreagera med SeM-ELISA vilket leder till falskt positiva hästar.

För att undvika detta har en ny metod tagits fram som använder sig av N-terminalen av SeM som är unik för *S. equi*. Den nya analysen görs parallellt med ytterligare en iELISA för att kvantifiera nivåerna av antikroppar mot *S. equi* specifika del av SEQ2190. Ett positivt resultat ges om en eller båda av iELISA analyserna överstiger den positiva gränssättningen. En jämförelse mellan dubbelantigen iELISA och kommersiell iELISA, baserad på hela SeM-proteinet, visade att även vanliga iELISA hade en jämförelsevis liknande sensitivitet (90% jämfört med 93%) så diagnostiserade den 23% av de negativa proverna som positiva. Jämfört med den dubbla iELISA:n som gav en specificitet på 99% med betoning på dess förmåga att potentiellt identifiera infekterade djur innan de kan sprida smittan vidare (Waller, 2014).

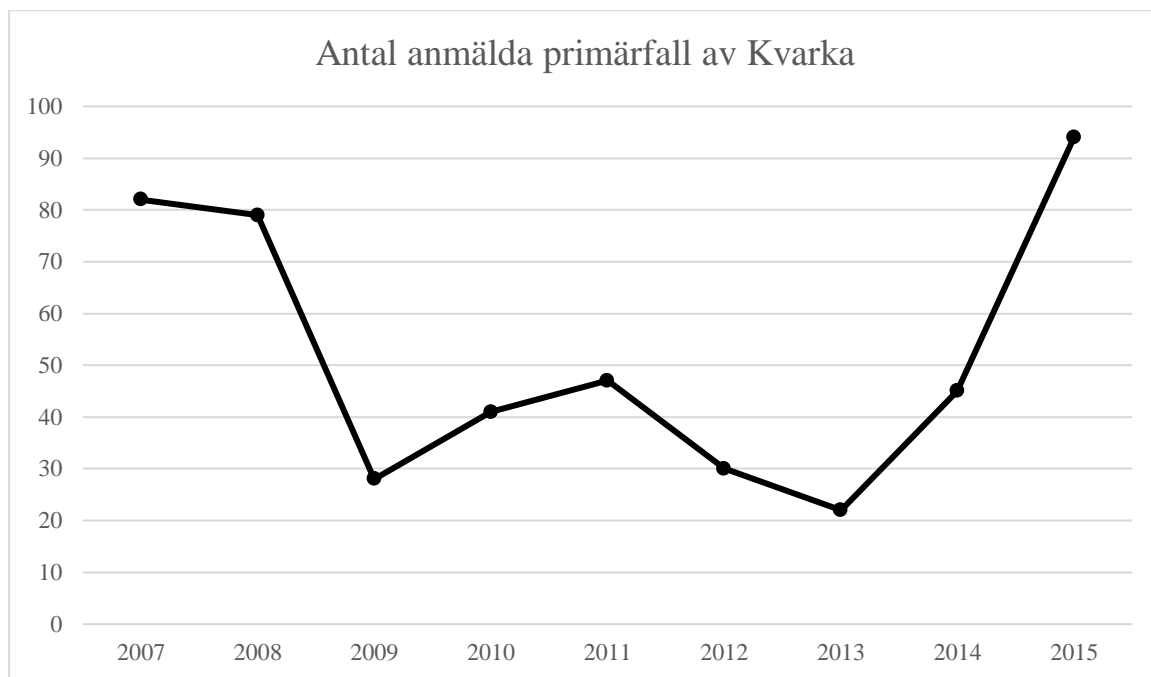
Ytterligare en studie påvisade att ELISA upptäcker IgG antikroppar till två *S. equi* –specifika antigen, vilket avslöjar om individen nyligen varit i kontakt med bakterien med en sensitivitet på 92% och specificitet på 91%. Positiva ELISA-resultat bör hanteras varsamt och som en indikation på att isolering av individen samt endoskopi och fortsatt utredning är rekommenderat (Knowles *et al.*, 2010).

Serologi är en tillgänglig och användbar metod som kan identifiera en del av de drabbade hästarna men klassas inte som en adekvat diagnostiseringsmetod för rutinfallen eller de hästar som synbart inte avger smittan. Studier som gjorts stödjer alltså inte serologi som en adekvat diagnostiseringsmetod då sensitiviteten och specificiteten är för låg (Mallicote, 2015).

En fullständig hematologisk status (complete blood count) och plasma fibrinogen koncentration är användbart när det kommer till att diagnostisera och skilja hästar med akut *S. equi* infektion från de med en akut viral infektion (Taylor & Wilson, 2006). En begränsning inom serologin för att upptäcka förekomsten av kroniska bärare kan dock vara att vissa inte kan upprätthålla en detekterbar specifik antikroppsreaktion till infektionen (Fintl *et al.*, 2000).

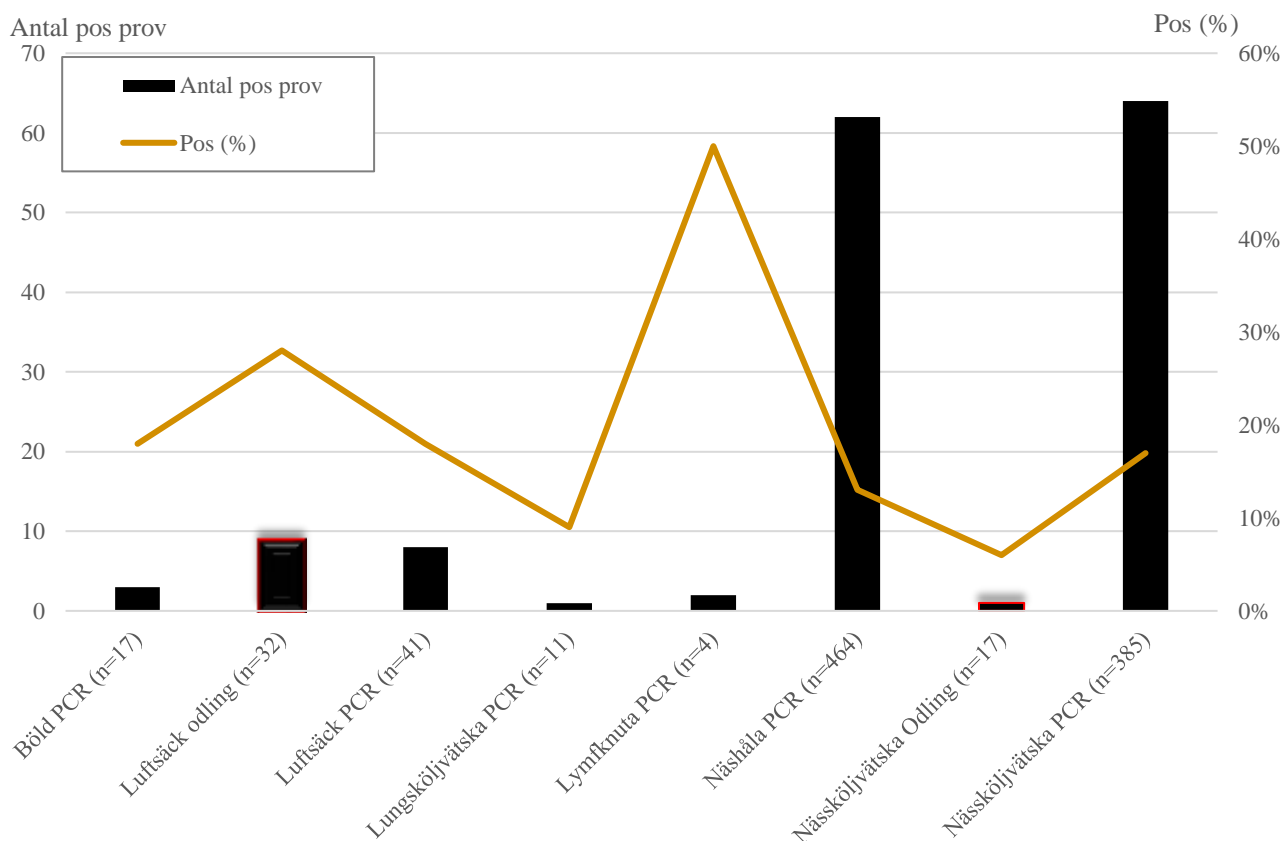
Förekomst i Sverige

Kvarka är en anmälningspliktig sjukdom som redan vid misstanke ska rapporteras till länsveterinären. Under åren 2004-2015 i Sverige konstaterades kvarka i snitt hos 53 stall per år (SVA, 2017). Nedan i Figur 1 kan antalet anmälda primärfall av kvarka år 2007-2015 studeras. Observera att detta endast är primärfall, vilket innebär att oavsett om fler hästar på samma gård kan ha insjuknat så är de i statistiken registrerade som ett fall. Detta säger alltså inget om totala antalet drabbade hästar under tidsperioden. En ökning av antalet inrapporterade primärfall kan studeras mellan 2009 och 2015 men omfattningen av detta och huruvida antalet insjuknade hästar ökat eller minskat går inte att spekulera i. Antalet hästar i Sverige har däremot ökat, år 2004 fanns det 283 100 hästar och år 2010 noterades en ca 20% ökning till 362 700 hästar (Jordbruksverket, 2011).



Figur 1. Antalet anmälda primärfall av kvarka på häst i Sverige år 2007-2015 (www.jordbruksverket.se)

Under 2016 analyserad SVA 1166 st prover med frågeställningen kvarka. Av dessa 1166 prover kunde *S. equi* påvisas i 173st, fördelningen av positiva analys svar och vilken analys- samt provtagningsmetod som användes kan studeras nedan i Figur 2 (Hansson, I., 2017, personlig kommunikation).



Figur 2. Fördelningen av antalet prover och provtagningsställe analyserade på SVA 2016 där *S. equi* påvisats (totalt 173st.) (Hansson, I., 2017, personlig kommunikation), n= total antal analyserade prov på respektive provtagningsställe.

DISKUSSION

Då morbiditeten för kvarka är nästan 100% (Furniss *et al.*, 2007) är det viktigt att tidigt identifiera smittbärande individer för att förhindra vidare smittspridning (Tirosh-Levy *et al.*, 2016).

Provtagning

abscesser eller empyem i luftsäckarna. Det provtagningsmaterial som i ett flertal studier visat högst känslighet är nasofaryngala- eller luftsäcksköljprover (Boyle *et al.*, 2012; Lindahl *et al.*, 2013; Mallicote, 2015). Sköljningarna anses vara en säkrare metod då en större yta provas jämfört med ett svabbprov (Pusterla *et al.*, 2006; Taylor & Wilson, 2006).

Användandet av flocked swabs vid odling har inte visat sig ge något statistiskt säkerställt bättre resultat än om provtagningen togs med en torr rayons odlings svabb (Boyle *et al.*, 2012). Endast bomullssvabben var statistiskt sämre än resterande provtagningsmaterial (Lindahl *et al.*, 2013). Nylonsvabbar visade sig vara effektivast i att både samla in och släppa ifrån sig bakterier jämfört med rayon svabbar. Transportmediet som medföljer E-swab var även lämpligt för förberedandet av DNA direkt för odling. Bakteriell odling visade sig ge ett bättre resultat då bakterien förkom i större mängder, men PCR var överlägsen då patogenen endast förkom i små mängder. En studie visade även att centrifugering av proverna innan odling snarare minskad sensitiviteten (Boyle *et al.*, 2012).

Det är viktigt att inte bara isolera infekterade hästar utan att också ta prover för att identifiera kroniska smittbärare (Waller & Jolley, 2007). Luftsäckarna bör ligga i fokus då kroniska bärare av kvarka utreds menar Fintl *et al.* (2000). En svensk studie av Lindahl *et al.* (2013) visade att prover tagna från abscesser har betydligt högre sensitivitet än prover tagna från näshålan. Detta kan förklaras med att bakterieutsöndringen hos individen varierar, variation i provtagningsmaterial, potentiell överväxt av andra patogener samt att det troligen finns en högre koncentration av bakterier i abscesserna (Grønbæk *et al.*, 2006; Lindahl *et al.*, 2013).

Användandet av flocked swabs som provtagningsutrustning i kombination med PCR eller odling ökade inte påvisande av patogener, material insamlat via flocked swabs gav inte heller något statistiskt säkerställt bättre resultat än om materialet insamlades med en torr rayon odlings svabb. Studien gav en indikation på att luftsäckarna i kontrast till nasofaryngala regioner är en mer tillförlitlig lokalisering för provtagning och upptäckt av *S. equi*. Både odling och PCR bör genomföras för säkrast resultat (Boyle *et al.*, 2016).

Pulsifierande gelelektrofores kan vara lämpligt att använda för att jämföra olika *S. equi* isolat vid smittspårning (Lindahl *et al.*, 2011).

PCR

PCR är en snabb och effektiv metod när det kommer till att identifiera *S. equi*, det ska dock påpekas att metoden inte skiljer på DNA från döda eller levande bakterier. Flertalet studier har visat att den är känsligare än bakteriell odling framförallt om mycket små mängder bakterier finns i provet (Taylor & Wilson, 2006). PCR kan upptäcka DNA från levande bakterier i de nasofaryngala delarna av luftsäckarna (Newton *et al.*, 2000) och är därför viktig för att kunna

identifiera symptomfria bärare (Mallicote, 2015). PCR har i ett flertal studier visat sig vara en känsligare analys än odling vid påvisandet av *S. equi* från svabbprover. Liknande resultat noterades för luftsäcksprover där 76% var PCR positiva och i endast 59% kunde *S. equi* påvisas vid positiva (Cordoni *et al.*, 2015). PCR kan också att skilja på de två subtyperna *S. equi* och *S. zooepidemicus* vid de fall där de förekommer i blandflora. Möjligheten att påvisa *S. equi* via PCR ökar om fler prover tas, när tre prover på samma individ analyserades jämfört med ett prov så steg sensitiviteten från 70% till 85% vid odling (Newton *et al.*, 2000; Cordoni *et al.*, 2015).

Lindahl *et al.* (2013); Mallicote (2015) rekommenderar att en PCR bör utföras om endast en provtagningsanalys är möjlig då den ger ett mer tillförlitligt svar med högre sensitivitet jämfört med en bakteriell odling.

Utvecklingen av qPCR har sänkt diagnostiseringsmetodens tidsspann till endast 2 timmar vilket är en fördel då ett snabbt analys svar kan innebära att åtgärder kan påbörjas i ett tidigare skede för att stoppa smittspridningen (Waller, 2014). Problematiken med att upptäcka DNA från döda bakterier, falskt positiva hästar, förhindras genom ordentlig rengöring av instrument samt att DNA inte lever kvar på mukosala ytor. Waller (2014) anser att triplex qPCR bör anses och användas som "the golden standard" då triplex qPCR har en väldigt hög sensitivitet (93,9%) och specificitet (96,6%) samt upptäcker låga kvantiteter av bakterien trots förekomst av kontaminerande bakterier. Det här reducerar antalet falskt positiva resultat och ger samtidigt ingen ökad kostnad för djurägaren (Webb *et al.*, 2013). Boyle *et al.* (2016) anser att real-tids PCR kan ersätta vanlig bakterieodling som gyllne standarden för provtagning av *S. equi*. De föreslår att både odling och PCR bör utföras vid varje prov som lämnas in med misstanke om *S. equi* för att uppnå den högsta sensitiviteten.

Nested PCR är en species-specifik och känslig metod för att dignostisera *S. equi* från kliniska prover. Denna metod minskar risken för falskt positiva provresultat, då det ofta förekommer andra medlemmar ur Lancefield grupp C i de övre luftvägarna hos häst, och om metoden inte är species-specifik kan detta ge falskt positiva utslag. Ytterligare problem med kommensaler som andra betahemolyserande Streptokocker än *S. equi* är att dessa kan ha SeM-liknande proteiner och kan ge felaktiga resultat. Nested PCR är mer tidskrävande än en vanlig PCR och är känsligare för kontamination av omgivningarna men den har högre sensitivitet och specificitet (Grønæk *et al.*, 2006).

Odling

En bakteriell odling kräver minst 24 timmars inkubering, och förlitar sig mycket på att adekvat infektiöst material hittas och frodas i kulturmediet (Waller 2014). Oftast krävs odling på COBA vilket hämmar växten av den normalflora som ofta förekommer i övre luftvägarna hos häst. En odling ger lätt falskt negativa provsvar då *S. equi* inte kan upptäckas på grund av att riklig växt bakterier som finns i normalfloran i övre luftvägarna (Mallicote, 2015). När de betahemolytiska kolonierna ska isoleras är det ofta co-founded av fler bakterier ex. *S. zooepidemicus* vilket kan bidra till falskt negativa provsvar (Webb *et al.*, 2013). Enligt Lindahl *et al.* (2013) påvisas *S. equi* hos endast 60% av de kliniskt sjuka hästarna. Men en odling ger dock möjligheten till att identifiera andra bakterier som kan ge kvarkaliknande symptom vilket är fördelaktigt (Grønæk *et al.*, 2006).

Serologi iELISA

Sensitiviteten och specificiteten för ELISA är för låg enligt Mallicote (2015), men bidrar med möjligheten till att fånga upp individer som nyligen varit i kontakt med smittan och även de som är symptomfria bärare (Knowles *et al.*, 2010). SeM-protein har dock en homolog SzM i *S. zooepidemicus* som kan leda till falskt positiva analyssvar (Waller, 2014). Detta kan undvikas via en ny metod som använder sig av N-terminalen som är specifik för *S. equi* vilket ger en säkrare diagnostik. Dubbel ELISA gav en specificitet på 99.3% som kan identifiera potentiellt infekterade djur innan de kan sprida smittan vidare (Waller, 2014). Det är dock ett bra verktyg för att skilja bakteriella infektioner från virala med blodprov (Taylor & Wilson, 2006) och kan även påvisa om hästen har purpura hemorragica då nivåerna av antikroppar mot SeM-protein är högre hos dessa hästar (Waller & Jolley, 2007).

Förekomst i Sverige

Antalet hästar i Sverige ökar stadigt (Jordbruksverket, 2011), det är dock svårt att dra några slutsatser om huruvida detta påverkar antalet hästar som insjuknar i kvarka då de rapporter som finns endast innefattar primärfallen och inte hur många individer som insjuknar på varje anläggning vid utbrott. De flesta positiva proverna som analyserades på SVA under 2016 var från nässköljning och nashålan (Figur 2), majoriteten av dessa analyserades med hjälp av PCR vilket överensstämmer med rekommendationerna från forskningen över vilken metod som är lämpligast. En sköljning möjliggör provtagning av en större yta jämfört med en svabb och anledningen till att nashålan var vanlig som provtagningsområde är förmodligen dess anatomiskt lättåtkomliga läge. Dock var prevalensen för just dessa två provtagnings- och analysmetoder jämförelsevis låg, strax under 20% (Figur 2). Möjligen hade fler tysta smittbärare upptäckts om prover på luftsäckarna analyserats, detta är dock svårt att utvärdera.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Ahmed N. F. Neamat-Allah & Hend M. El Damaty (2016). Strangles in Arabian horses in Egypt: Clinical, epidemiological, hematological, and biochemical aspects. *Veterinary World*, 9 (8): 820-826. [online]. Available from: <http://www.veterinaryworld.org/Vol.9/August-2016/4.pdf>. [Accessed 2017-03-03].
- Boyle, A. G., Boston, R. C., O'Shea, K., Young, S. & Rankin, S. C. (2012). Optimization of an in vitro assay to detect *Streptococcus equi* subsp. *equi*. *Veterinary Microbiology* [online], 159(3–4), pp 406–410. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113512002635>. [Accessed 2017-03-03].
- Boyle, A. g., Rankin, S. c., Duffee, L., Boston, R. c. & Wheeler-Aceto, H. (2016). *Streptococcus equi* Detection Polymerase Chain Reaction Assay for Equine Nasopharyngeal and Guttural Pouch Wash Samples. *Journal of Veterinary Internal Medicine* [online], 30(1), pp 276–281. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.13808/abstract>. [Accessed 2017-03-03].
- Båverud, V., Johansson, S. K. & Aspan, A. (2007). Real-time PCR for detection and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Veterinary Microbiology* [online], 124(3–4), pp 219–229. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113507001873>. [Accessed 2017-03-03].
- Chambers Catheter - Equine Speciality Instruments*. [online]. Available from: <http://www.germedusa.com/p-188-chambers-catheter.aspx>. [Accessed 2017-03-03].
- Cordoni, G., Williams, A., Durham, A., Florio, D., Zanoni, R. G. & La Ragione, R. M. (2015). Rapid diagnosis of strangles (*Streptococcus equi* subspecies *equi*) using PCR. *Research in Veterinary Science* [online], 102, pp 162–166. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528815300394>. [Accessed 2017-03-03].
- Enheten för internationella frågor och djurhälsopersonal. *Statistik över primärfall av anmälningspliktiga djursjukdomar 2007*. [online] Jordbruksverket. Available from: <http://www.jordbruksverket.se/amnesomraden/djur/sjukdomarochsmittskydd/anmalningsplikt/sjukdomsstatistik/arkivarsstatistik/2007.4.4ef62786124a59a20bf80001419.html>. [Accessed 2017-03-07].
- Enheten för internationella frågor och djurhälsopersonal. *Statistik över primärfall av anmälningspliktiga djursjukdomar 2008*. [online] Jordbruksverket. Available from: <http://www.jordbruksverket.se/amnesomraden/djur/sjukdomarochsmittskydd/anmalningsplikt/sjukdomsstatistik/arkivarsstatistik/2008.4.4ef62786124a59a20bf80002439.html>. [Accessed 2017-03-03].
- Enheten för internationella frågor och djurhälsopersonal. *Statistik över primärfall av anmälningspliktiga djursjukdomar 2009*. [online] Jordbruksverket. Available from: <http://www.jordbruksverket.se/amnesomraden/djur/sjukdomarochsmittskydd/anmalningsplikt/sjukdomsstatistik/arkivarsstatistik/2009.4.795c224d1274198ffc28000304.html>. [Accessed 2017-03-07].
- Enheten för internationella frågor och djurhälsopersonal (2010). *Årsrapport över anmälningspliktiga djursjukdomar 2010* [online]. Jordbruksverket. Available from: <http://www.jordbruksverket.se/download/18.6160f287138226df0f18000929/1370041134998/Sjukdomsstatistik+2010.pdf>. [Accessed 2017-03-03].

- Enheten för internationella frågor och djurhälsopersonal (2011). *Årsrapport över anmälningspliktiga djursjukdomar 2011* [online]. Jordbruksverket. (Dnr: 33-3/11). Available from: <http://www.jordbruksverket.se/download/18.58f2066813fc03d6a20495/1373440744677/Rapport+över+anmälningspliktiga+djursjukdomar+2011+SM.pdf>. [Accessed 2017-03-03].
- Enheten för internationella frågor och djurhälsopersonal (2012). *Årsrapport över anmälningspliktiga djursjukdomar 2012* [online]. Jordbruksverket. (Dnr 33-3/12). Available from: <http://www.jordbruksverket.se/download/18.25a2ec014c4a6848aa26e76/1427206390626/Rapport%2B%C3%B6ver%2Banm%C3%A4lningspliktiga%2Bdjursjukdomar%2B2012%2Bversion%2B2%2BSM%2BAugusti%2B2013.pdf>. [Accessed 2017-03-03].
- Enheten för internationella frågor och djurhälsopersonal (2013). *Årsrapport över anmälningspliktiga djursjukdomar 2013* [online]. Jordbruksverket. (Dnr 6.1.18-9/13). Available from: <http://www2.jordbruksverket.se/download/18.508cbfd41527a5fb881a895f/1453888767126/ovr310v2.pdf>. [Accessed 2017-03-03].
- Enheten för internationella frågor och djurhälsopersonal (2014). *Årsrapport över anmälningspliktiga djursjukdomar 2014* [online]. Jordbruksverket. (Dnr 6.2.18-181/14). Available from: <http://www2.jordbruksverket.se/download/18.23c790b5156df169bede497d/1472801193297/ovr394.pdf>. [Accessed 2017-03-03].
- Enheten för internationella frågor och djurhälsopersonal (2015). *Årsrapport över anmälningspliktiga djursjukdomar 2015* [online]. Jordbruksverket. (Dnr 6.2.18-160/15). Available from: <http://www2.jordbruksverket.se/download/18.23c790b5156df169bede4ca7/1472801423313/ovr395.pdf>. [Accessed 2017-03-03].
- Fintl, C., Dixon, P. M., Brazil, T. J., Pirie, R. S. & McGorum, B. C. (2000). Endoscopic and bacteriological findings in a chronic outbreak of strangles. *Veterinary Record* [online], 147, pp 480–484. Available from: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/vetrec/147/17/480.full.pdf>. [Accessed 2017-03-03].
- flocked swab*. [online] (2012) (TheFreeDictionary.com). Available from: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/flocked+swab>. [Accessed 2017-03-03].
- Furniss, C., Carstens, A. & Cilliers, I. (2007). Eustachian tube diverticulum chondroids and neck abscessation in a case of *Streptococcus equi* subsp. *equi*: clinical communication. *Journal of the South African Veterinary Association* [online], 78(3), pp 166–170. Available from: <http://www.jsava.co.za/index.php/jsava/article/view/311>. [Accessed 2017-03-07].
- Grønabæk, L. M., Angen, Ø., Vigre, H. & Olsen, S. N. (2006). Evaluation of a nested PCR test and bacterial culture of swabs from the nasal passages and from abscesses in relation to diagnosis of *Streptococcus equi* infection (strangles). *Equine Veterinary Journal* [online], 38(1), pp 59–63. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2746/042516406775374324/abstract>. [Accessed 2017-03-03].
- Jordbruksverket (2011). *Hästar och anläggningar med häst 2010. Resultat från en intermittent undersökning* [online]. Stockholm: Statistiska Centralbyrån. (Statistiska meddelanden. Serie JO, Jordbruk, skogsbruk och fiske; JO 24 SM 1101).
- Knowles, E. J., Mair, T. S., Butcher, N., Waller, A. S. & Wood, J. L. N. (2010). Use of a novel serological test for exposure to *Streptococcus equi* subspecies *equi* in hospitalised horses. *Veterinary Record* [online], 166, pp 294–297. Available from: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/vetrec/166/10/294.full.pdf>. [Accessed 2017-03-03].

- Lindhahl, S., Båverud, V., Egenvall, A., Aspán, A. & Pringle, J. (2013). Comparison of Sampling Sites and Laboratory Diagnostic Tests for *S. equi* subsp. *equi* in Horses from Confirmed Strangles Outbreaks. *Journal of Veterinary Internal Medicine* [online], 27(3), pp 542–547. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.12063/abstract>. [Accessed 2017-03-03].
- Lindhahl, S., Söderlund, R., Frosth, S., Pringle, J., Båverud, V. & Aspán, A. (2011). Tracing outbreaks of *Streptococcus equi* infection (strangles) in horses using sequence variation in the *seM* gene and pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology* [online], 153(1–2), pp 144–149. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113511001829>. [Accessed 2017-03-03].
- Mallicote, M. (2015). Update on *Streptococcus equi* subsp. *equi* Infections. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* [online], 31(1), pp 27–41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749073914001011>. [Accessed 2017-03-03].
- Newton, J. R., Verheyen, K., Talbot, N. C., Timoney, J. F., Wood, J. L. N., Lakhani, K. H. & Chanter, N. (2000). Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of *Streptococcus equi*. *Equine Veterinary Journal* [online], 32(6), pp 515–526. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2746/042516400777584721/abstract>. [Accessed 2017-03-03].
- Pusterla, N., Watson, J. L. & Wilson, W. D. (2006). Diagnostic Approach to Infectious Respiratory Disorders. *Clinical Techniques in Equine Practice* [online], 5(3), pp 174–186. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534751606000278>. [Accessed 2017-03-03].
- Ritz, C. & Spiess, A.-N. (2008). qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Bioinformatics* [online], 24(13), pp 1549–1551. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/24/13/1549/238435/qpcR-an-R-package-for-sigmoidal-model-selection-in>. [Accessed 2017-03-03].
- SVA (2017-01-19) *Kvarka hos häst*. Available from: <http://www.sva.se/djurhalsa/hast/infektionssjukdomar-hast/kvarka-hast> [Accessed 2017-03-10]
- SVA (2016). PCR-metoden. Available from: <http://sva.se/analyser-och-produkter/pcr-metoden>. [Accessed 2017-03-03].
- Taylor, S. D. & Wilson, W. D. (2006). *Streptococcus equi* subsp. *equi* (Strangles) Infection. *Clinical Techniques in Equine Practice* [online], 5(3), pp 211–217. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S153475160600031X>. [Accessed 2017-03-03].
- Tirosh-Levy, S., Blum, S. E., Steward, K. F., Waller, A. S. & Steinman, A. (2016). *Streptococcus equi* subspecies *equi* in horses in Israel: seroprevalence and strain types. *Veterinary Record Open* [online], 3(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5013422/>. [Accessed 2017-03-03].
- VetBact.org. [online] (2017) *Streptococcus equi* subsp. *equi*. Available from: <http://www.vetbact.org/vetbact/?LANG=sv&artid=14>. [Accessed 2017-03-07].
- Waller, A. S. (2014). New Perspectives for the Diagnosis, Control, Treatment, and Prevention of Strangles in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* [online], 30(3), pp 591–607. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749073914000650>. [Accessed 2017-03-03].

Waller, A. S. & Jolley, K. A. (2007). Getting a grip on strangles: Recent progress towards improved diagnostics and vaccines. *The Veterinary Journal* [online], 173(3), pp 492–501. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109002330600092X>. [Accessed 2017-03-03].

Webb, K., Barker, C., Harrison, T., Heather, Z., Steward, K. F., Robinson, C., Newton, J. R. & Waller, A. S. (2013). Detection of *Streptococcus equi* subspecies *equi* using a triplex qPCR assay. *The Veterinary Journal* [online], 195(3), pp 300–304. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023312003103>. [Accessed 2017-03-03].